مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد الثاني والعشرون - المجلد الأول - علوم الحياة - أيلول 2023 م
doi.org/10.52866/esj.2023.01.22.06

التحري عن جينات cdtB و uspA في الإشريكية القولونية المعزولة من المرضى المصابين بعدوى المسالك البولية ودراسة تحليل شجرة النشوء والتطور

زينة هادي سعيد 1، علي صالح حسين 2، تغريد خضر. محمد 3
1 قسم علوم الحياة، كلية التربية، الجامعة العراقية، بغداد، العراق، zenah_hadi@mtu.edu.iq
2 قسم علوم الحياة، الجامعة العراقية، بغداد، العراق، alisalih60@yahoo.com
3 قسم تقنيات المختبرات الطبية، المعهد الطبي التقني - بالمنصور، الجامعة التقنية الوسطى، taghreidkheder@mtu.edu.iq

مستخلص:

شملت الدراسة 471 عينة ادرار من مرضى مصابين بالتهاب المسالك البولية، حيث تم الحصول على 50 عزلة من بكتريا Escherichia coli (E.coli) وكانت نسبة الاصابة اعلى بالاناث من الذكور. اظهرت نتائج الفحص لعينات الادرار الايجابية لوجود خلايا القيح اعلى من 5/ حقل مجهري، كما اعطت العزلات نتيجة موجبة لاختبار الكتاليز واختبار الاندول وكذلك لاختبار المثيل الاحمر، اما الاختبار فوكس بروسكاور واستهلاك السترات كانت النتيجة سالبة لكلا الاختبارين. وجد ان تركيز DNA لجميع العزلات بين (15-28) نانوغرام/ مايكروليتر، اما نقاوة الحامض النووي DNA كانت من (1.56-2). تم التحري عن الحامض النووي بأستعمال طريقة الترحيل الكهربائي وظهرت حزم DNA تحت الاشعة فوق البنفسجية وصبغت الحزم بوساطة الصبغة الحمراء. تم التحري عن جيني UspA وCdtB في 20 عزلة من بكتريا E.coli في الدراسة الحالية بأستعمال جهاز PCR. ان 10 عزلات من بكتريا E.coli كانت تحتوي على جين UspA اي بنسبة ٪50 من مجموع العزلات ولوحظ ان 4 عزلات فقط كانت تمتلك جين CdtB من مجموع العزلات اي بنسبة ٪20. اظهرت العزلات نسب تطابق بنسبة ٪99 لكلا الجينين مع تابعات بنك الجينات NCBI. وفقا للتتابعات الخاصة بـ NCBI وجد ان الجينات تحتوي على عدد قليل من الطفرات داخل كل عينة، تم رسم الشجرة الوراثية التطورية لبكتريا E.coli.

الكلمات الرئيسية: E.coli ، التهابات المسالك البولية ، bp ، NCBI ، PCR ، CdtB ، UspA ، الطفرات.

Investigations of *cdtB* and *UspA* genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection and study the Phylogenetic tree analysis

Zenah Hadi Saied [1], Ali Saleh Hussein [2], Taghreed Kudhur. Mohammed [3]
[1] Department of Biology, College of Education, Al-Iraqia University, Baghdad, Iraq, zenah_hadi@mtu.edu.iq
[2]Department of Biology, Al-Iraqia University, Baghdad, Iraq, alisalih60@yahoo.com
[3]Department of Medical Laboratory Technologies, Institute of Medical Technology-Al-Mansour, Middle Technical University, Baghdad, Iraq, taghreidkheder@mtu.edu.iq

Abstract:

The study included 471 urine samples from patients with urinary tract infection, where 50 isolates of Escherichia coli (*E.coli*) were obtained, and the infection rate was higher in females than males. Examination results for urine samples showed positive for the presence of pus cells higher than 5/microscopic field, and the isolates gave a positive result for the catalase test, the indole test, as well as for the methyl red test. As for the Fox Proscur test and citrate consumption, the result was negative for both tests. It was found that the DNA concentration of all isolates ranged between (15-28) ng/microliter, while the DNA purity ranged from (1.56-2). The DNA was investigated using the electrophoresis method, and the DNA bundles appeared under ultraviolet light, and the bundles were stained with red dye. *UspA* and *cdtB* genes were investigated in 20 *E.coli* isolates in the current study using PCR. That 10 isolates of *E.coli* bacteria contained the *UspA* gene, i.e. 50% of the total isolates, and it was noted that only 4 isolates had the *cdtB* gene out of the total isolates, i.e. 20%. The isolates showed a (99%) match rate for both genes with the NCBI genebank affiliates. According to the NCBI sequences, the genes were found to contain a few mutations within each sample; the phylogenetic tree of *E.coli* bacteria was drawn.

Keywords: *E.coli*, urinary tract infections, *UspA*, *CdtB,* PCR, NCBI, bp, Mutations.

المقدمة Introduction

تعد بكتريا أيشريشيا القولون ((E.coli Esch-erichia coli سالبة لصبغة كرام Gram negative bacteria، لها شكل عصوي كروي coccobacil-lus، متحركة Motile أو غير متحركة Non-Motile، تعمل على تخمير سكر اللاكتوز Lactose، وأغلب السلالات لها القدرة على تخمير سكريات أخرى مثل الرامنوز Ramnose والسوربيتول Sorbetol. وهي فلورا طبيعية Normal flora موجودة في أمعاء الإنسان والحيوان (Al-Saadi and Abdullah, 2019). تنتمي إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae. تسبب E.coli العديد من الأمراض للإنسان مثل الإسهال diarrhea والتهاب السحايا عند حديثي الولادة Neonatal meningitis والأنتانات (تسمم الدم) sepsis وتجرثم الدم Bacteremia وألتهابات المسالك البولية Urinary Tract Infections (UTIs) (Al-Saa-di and Abdullah, 2019). تعد عدوى المسالك البولية UTIs من أكثر الأمراض البكتيرية المنتشرة في جميع أنحاء العالم، وأكثر أمراض الجهاز البولي-التناسلي شيوعاً عند الأطفال. حيث تحدث معظم عدوى المسالك البولية بسبب البكتريا التي تعتبر المسبب الرئيس والمسؤول عن أكثر من (95٪) من حالات العدوى (Lee et al., 2016). تنشأ عدوى المسالك البولية غالباً بسبب العصيات الهوائية السالبة لصبغة كرام الموجودة في الجهاز الهضمي Gastrointestinal Tract (GI)، أهمها بكتريا E.coli و Klebsiella، Enterobactor، Citrobacter، Proteus وSerratia (Mao et al., 2012; Mohammed et al., 2016).

تتكون عائلة بروتين الإجهاد الشامل ((USP Universal Stress Protein من مجموعة تقليدية Conserved من البروتينات الموجودة في جينومات البكتريا، Archaea، الفطور الأوالي Protozoa والنباتات. إن البروتين النوعي لـ E.coli المسببة للأمراض البولية Uropathogenic-Spe-cific Gene (Usp) هو سم جيني Genotoxin فعال ضد خلايا الثدييات ويترافق مع السلالات التي تسبب التهاب البروستات، التهاب الحويضة والكلية وتجرثم الدم. لقد ثبت أن السموم الجينية تثير التسرطن من خلال تعزيز تلف الحمض النووي في الخلايا المضيفة (Grasso and Frisan, 2015; Nip-ič, et al., 2013). أما جين Cytolethal distending toxin (CDT) هو سم من طبيعة بروتينية يستهدف الحمض النووي، تنتجه عدة سلالات من مسببات الأمراض البكتيرية السالبة لصبغة الغرام. يتم ترميز CDT بواسطة أوبرون Operon من ثلاثة جينات متجاورة، cdtA،cdtB و cdtC، منتجاتها بروتينات مفرزة ذات أوزان جزيئية حوالي 27، 29 و 20 كيلو دالتون على التوالي. (Hontz et al., 2006). ولقلة الدراسة حول هذين الجينين في العراق لذا الغرض من البحث هو الكشف عن بكتريا لدى المرضى المصابين بألتهاب المسالك البولية E.coliوالتحري عن جينات cdtB و Usp.

طرائق العمل Methods

- **جمع العينات (Collection of specimens):** جُمعت 471 عينة إدرار من مرضى مصابين بالتهاب المسالك البولية UTIs الوافدين إلى مستشفيات بغداد، تراوحت أعمارهم بين (70-18) سنة، ومن كلا الجنسين (ذكور وإناث)، جُمعت العينات ضمن الفترة من 2022-08-28 الى 2022-11-28

● **تحليل الإدرار** (Urine analysis)

1. **الفحص المجهري والمظهري لعينات الادرار** (Microscopic and macroscopic examination for urine samples) : تم إجراء الفحص الفيزيائي (المظهر appearance، اللون colour، الرائحة odour، والكثافة النوعية specific gravity) لعينات الإدرار. وتم استعمال شرائط rapid dipstick Urine (Harris, 1968; Harris, 1969; Rodriguez, et al., 2011). بعد وضع 10 مل من كل عينة من عينات البول في أنبوبة طرد مركزي معقمة تم تحضير مسحات الشرائح الرطبة wet slide smears تم التقصّي عن الخلايا القيحية (pus cells). (Rodriguez, et al., 2011)

2. **صبغ الرواسب البولية** (Staining of Urine Deposits): تم اتباع طريقة العمل حسب (Harris, 1969).

● **تشخيص العزلات البكتيرية**: (Identification of bacterial isolates) (Baron, et al., 2007). كما تم تشخيص البكتريا اعتماداً على الاختبارات البايوكيميائية التي تضمنت إختبار الكاتاليز (Catalase Test)، إختبار الاوكسيديز (Oxidase Test)، إختبار الحركة، إختبار الإمفك (IMViC Test)، والتشخيص بأستعمال نظام (API 20E).

● **الدراسة الجينية للعزلات البكتيرية** (Genetic Study of Bacterial Isolates)

1- **أستخلاص الحامض النووي البكتيري** (Extraction of Bacterial DNA) : تم أستخلاص الحمض النووي البكتيري DNA من عزلات البكتريا النامية في الوسط الزرعي بالأعتماد على طريقة عمل عدة الاستخلاص (ZR Fungal/ Bacterial/ Yeast DNA MiniPrepTM, Catalog No. D6005).

2- **التحري عن تركيز ونقاوة الحامض النووي البكتيري المستخلص** DNA (Determination the concentration and purity of the extracted bacterial DNA)

تم قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي البكتيري DNA الذي استخلص من عزلات بكتريا E.coli حسب المصدر (Nakayama, et al., 2016) باستخدام Nanodrop.

3- **تحضير نموذج الحامض النووي DNA والتحري عنه بوساطة الترحيل الكهربائي** (DNA sample preparation and detection by electrophoresis)

تم تحضير النموذج تبعاً لـ (Sambrook, 2001).

4- **الكشف عن الجينات المدروسة (Detection of genes)**: تم تحضير خليط التفاعل باستخدام عدة Maxime PCR preMix kit (i-Taq) 20 µlrxn تبعاً لتعليمات شركة التصنيع (iNtRON).

5- **التحري عن وجود حزم الحمض النووي المضخم DNA** (Detection of amplified DNA bands) : تم الكشف عن وجود حزم الحمض النووي DNA المضخم حسب المرجع (Sabharwal et al., 2014).

6- **تحديد التتابع الجيني** (Sequencing and sequence alignment): فصلت منتجات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) على 2٪ من هلام الاكاروز، وتم تصويره بوساطة تعريضه للـ UV عند طول موجة 260 نانوميتر بعد أن تم صبغه بصبغة حمراء Red safe. تم إجراء التتابع المجيني من قبل مركز الأجهزة الوطني الكوري (Ko-microgene – rea)، مختبر التكنولوجيا الحيوية، باستخدام جهاز DNA Sequencer 3730XL، والقيام ببحث التماثل

Homology باستخدام برنامج أداة البحث عن المحاذاة المحلية الأساسية Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program online التي تتوفر في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI) عن طريق الإنترنت على (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) وبرنامج BioEdit (Bioedit V.7.2) (program)).

- **تحليل الشجرة الوراثية لجيني** UspA **و** cdt B Phylogenetic tree analysis (neighbor- joining tree) of the UspA gene and cdt.

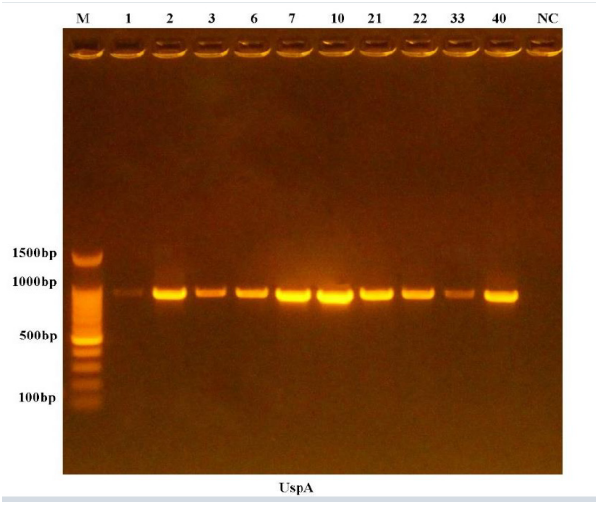
النتائج والمناقشة Results and discussion

تم الحصول على 50 عزلة من بكتيريا E.coli وبنسبة (10.61٪). وكانت نسبة الأصابة ببكتريا E.coli أعلى منها بالإناث عند الذكور، 39 (78٪) و 11 (22٪) على التوالي. أظهرت نتائج الفحص لعينات الأدرار الأيجابية لأختبار LE وخلايا القيح فيها أعلى من 5 خلية / حقل مجهري قد أعطت نتائج ايجابية عند زرع الادرار، أعطت العزلات نتيجة موجبة لأختبار الكتاليز catalase test ولأختبار الأندول Indole test. وكذلك نتيجة موجبة لأختبار أحمر المثيل Methyl red test وذلك لكون ان بكتيريا E.coli لها القدرة على إستهلاك وتخمير سكر الكلوكوز Glucose والبيبتوز Peptose أما إختباري فوكس بروسكاور Voges-Proskauer test، وأستهلاك السترات Citrate utilization، فقد أعطت العزلات البكتيرية كانت النتائج سالبة لهما. وهذا يتوافق مع دراسات عالمية عديدة. جائت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع ما توصل أليه (Ibrahim, et al., 2020) في دهوك إذ أظهرت نتائج دراسته ان 56.2٪ (من الحالات كانت بها مسببات للامراض البكتيرية، حيث كانت E.coli أكثر انواع البكتيريا شيوعاً بنسبة (24.7٪) قد وجدت في نماذج الادرار للمرضى الذين تم تشخيصهم باصابتهم بالتهاب المسالك البولية. (Ibrahim.

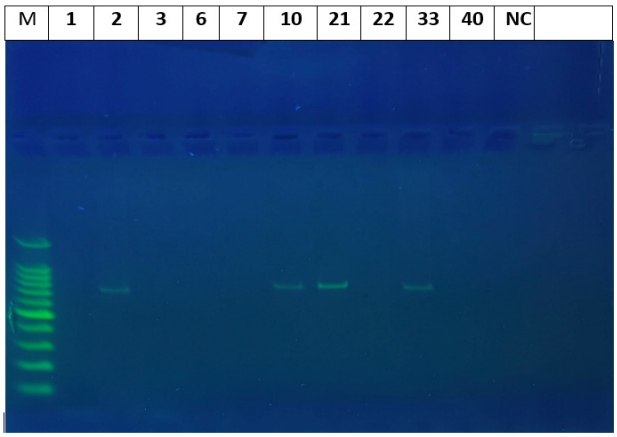
وجد إن تركيز الحامض النووي DNA لجميع العزلات يتراوح بين (28-15) نانوغرام/ مايكروليتر، أما نقاوة وتركيز الحامض النووي DNA، وكانت بين (1.56-2). إن نتائج الدراسة الحالية مقاربة الى حد ما لنتائج الباحثين (Mah-mood et al., 2017)، حيث كانت تراكيز DNA لبكتريا E.coli قد تراوحت بين 200 و 600 نانوغرام/ مايكروليتر، وكانت نقاوة DNA من 1.8 الـ 2. أستخلص الحامض النووي DNA من جميع العزلات البالغ عددها 50 عزلة E.coli، وتم التحري عن الحامض النووي بأستعمال طريقة الترحيل الكهربائي، وظهرت حزم DNA تحت الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet Transmission، وصبغت الحزم بوساطة الصبغة الحمراء Red Safe stain. إن نتائج الدراسة الحالية جاءت متوافقة مع العديد من الدراسات المحلية والدولية والتي تم فيها أن الباحثين قد أستخلصوا الحامض النووي DNA من E.coli المعزولة من عينات الأدرار لمرضى مصابين بألتهاب المسالك البولية (Ibrahim et al., 2021 and Vendrell et al., 2022).

تم التحري عن جيني UspA و cdtB في 20 عزلة من بكتريا E.coli في الدراسة الحالية بأستعمال جهاز Thermocycler of PCR. أظهرت النتائج الحالية أن 10 عزلات من E.coli تحتوي على جين UspA أي بنسبة 50٪ من مجموع العزلات (20عزلة). ولوحظ أن الحزم كانت لها وزن جزيئي Molecular

weight مقدارهُ 884 زوج قاعدي base pair الشكل (1). 4 عزلة فقط من 20 عزلة E.coli كانت تملك جين cdtB أي بنسبة ٪20 من مجموع العزلات، ووجد أن تلك الحزم لها وزن جزيئي مقداره 707 زوج قاعدي وكما هو مبين في الشكل (2).



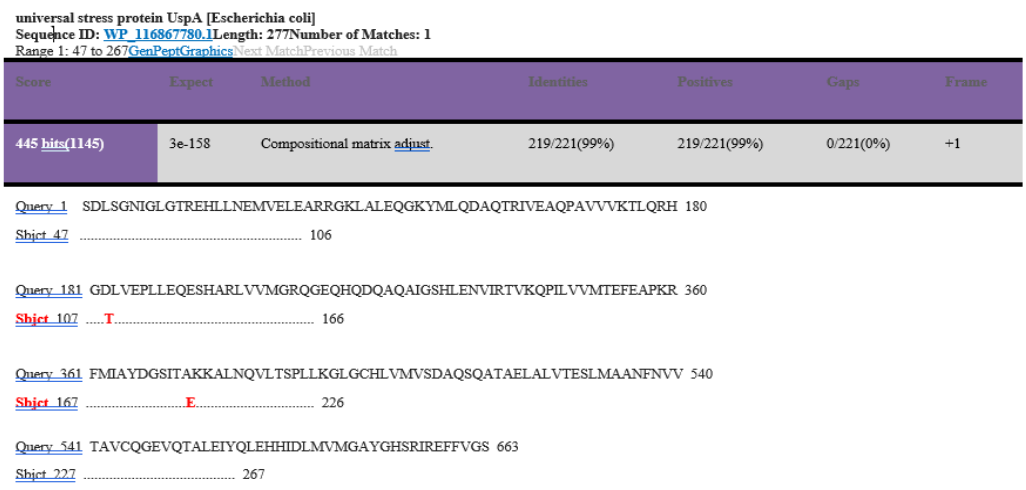
شكل (1): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للجين UpsA، حيث يظهر أن الوزن الجزيئي Mwt للحزم 884) زوج قاعدة (– أستعمل الأكاروز بتركيز ٪2 في الترحيل الكهربائي وبفرق جهد مقداره 70 فولت/ سم^2 لمدة 60 دقيقة. المسار M (DNA Ladder Marker) يمثل الدليل الحجمي (100–2000 زوج قاعدة). المسارات تحت الرقم (40، 33، 22، 21، 10، 7، 6، 3، 2، 1) تمثل عزلات E.coli التي تمتلك الجين .UpsA



شكل (2): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للجين cdtB، حيث يظهر أن الوزن الجزيئي Mwt للحزم (707 زوج قاعدة). أستعمل الأكاروز بتركيز ٪2 في الترحيل الكهربائي وبفرق جهد مقدارهُ 70 فولت/ سم^2 لمدة 60 دقيقة. المسار M (D-NA Ladder Marker) يمثل الدليل الحجمي 100–2000) زوج قاعدة(، أما المسارات تحت رقم (33، 21، 10، 2) فتمثل عزلات E.coli التي تمتلك الجين cdtB.

تمتلك بروتينات الأجهاد الشاملة(USP) Universal Stress Proteins ما يقارب من (140) إلى (160) حامضاً أمينياً، تحتاجها بكتريا E.coli في عمليات الأجهاد التأكسدي Oxidative Stress والألتصاق adhesion والحركة، يزداد إنتاج هذه البروتينات عند تعرض البكتريا الى ظروف بيئية غير مثالية لنموها مثل الصدمة الحرارية Heat Shock ونقص التغذية Starvation، أي أن لهذه البروتينات دوراً في بقاء بكتيريا E.coli مقاومة للظروف وحية (Heermann et al.,2009b)، وعند تسبب طفرة وراثية تفقد البكتريا من خلالها جين UspA، سيلاحظ أنخفاضاً في معدل بقاء البكتريا حية (Hensel., 2009) أما دور سم cdt فله نشاطاً في تحلل DNA لذا فهو يعمل كعمل أنزيم DNase الذي يمنع الخلية في النهاية من الأنقسام في مرحلة G2/M (Zaw et al., 2013). إن سم Cytolethal Distending toxin (CDT) هو بروتين معقد الذي يوجد منهُ ثلاثة من البيتيدات المتعددة (CdtC, CdtB, CdtA) هذا السم يسمى أيضاً بالسم الجيني Genotoxin لكونه محللاً للدنا (Mirzarazi et al., 2015) في دراسات محلية ودولية عديدة عن جين UspA وقليلة عن جين cdtB، وجد أن (Muhammed and Ghareb) في عام 2019 بفحص 43 عزلة لبكتريا E.coli التي جُمعت من مرضى القسطرة Catheterized Patients من مستشفيات أربيل، فوجد أن 15 عزلة كانت تحوي جين UspA، أي بنسبة 34.8% Mohammed and Ghareb, 2019)). بينما وجَد الباحثون Tanabe وآخرون في عام 2022 أن نسبة عزلات E.coli التي سببت إلتهاب المسالك البولية الحاد والمزمن في مرضى راقدين في مستشفيات البرازيل والتي تمتلك جين UspA هي 36 عزلة (32.1٪) أما عدد عزلات E.coli التي تمتلك الجين cdtB فكانت أثنان فقط أي ما تشكل نسبة (1.8٪) (Tanabe et al., 2022) ، وهذه النسب مقاربة الى حد ما النسب التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية.

حُلل تسلسل الحمض النووي لجيني UspA و cdtB لست عينات أظهرت أعلى مقاومة للمضادات الحيوية وقوية بتكوينها للاغشية الحيوية باستخدام جهاز automated DNA sequencer ABI3730XL لشركة Macrogen Corporation . حيث يوّلد التسلسل الآلي للحمض النووي DNA مخططاً لونياً chromatogram (يُعرف أيضاً باسم المخطط الكهربائي electropherogram) وتصويراً مرئياً visual depiction لتسلسل الحمض النووي الذي يشتمل على تسلسل النوكليوتيدات والقمم الواضحة كمخرجات حاسوبية peaks as a computer output. ولوحظ ان التسلسل الجيد بدأ عند القاعدة 20 الذي تميز بقمم شاهقة مميزة وواضحة distinct peaks مع القليل من التداخل little overlap ، وهي تمثل نتائج تسلسل جيدة. أظهرت النتائج في الشكل (3). أن التتابع للجين UspA الذي تم الحصول عليه مقارنةً مع التتابع الموجود في بنك الجينات الوطني (National Center Biotechnology Information NCBI CP114353.1)، قد أظهر نسبة تطابق alignment العينات الستة مع تتابعات الجينات في البنك بنسبة 99٪ لمنطقة 839 قاعدة نايتروجينية (bp)، والتي اجمالياً، سجلت alignment scored ما مجموعه 1550 قطعة (bites) . في حين أظهرت نتائج المحاذاة لجين CdtB في الشكل (4) محاذاة جين cdtB الذي تم الحصول عليه مع تسلسل قاعدة بيانات (NCBI(U04208.1)، والتي أظهرت تطابقا alignment بنسبة 99 ٪ لمنطقة 648 زوج قاعدة (bp)، والتي سجلت alignment scored ما مجموعه 1246 قطعة (bites).



universal stress protein UspA [Escherichia coli]
Sequence ID: WP_116867780.1Length: 277Number of Matches: 1
Range 1: 47 to 267GenPeptGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
445 bits(1145)	3e-158	Compositional matrix adjust.	219/221(99%)	219/221(99%)	0/221(0%)	+1

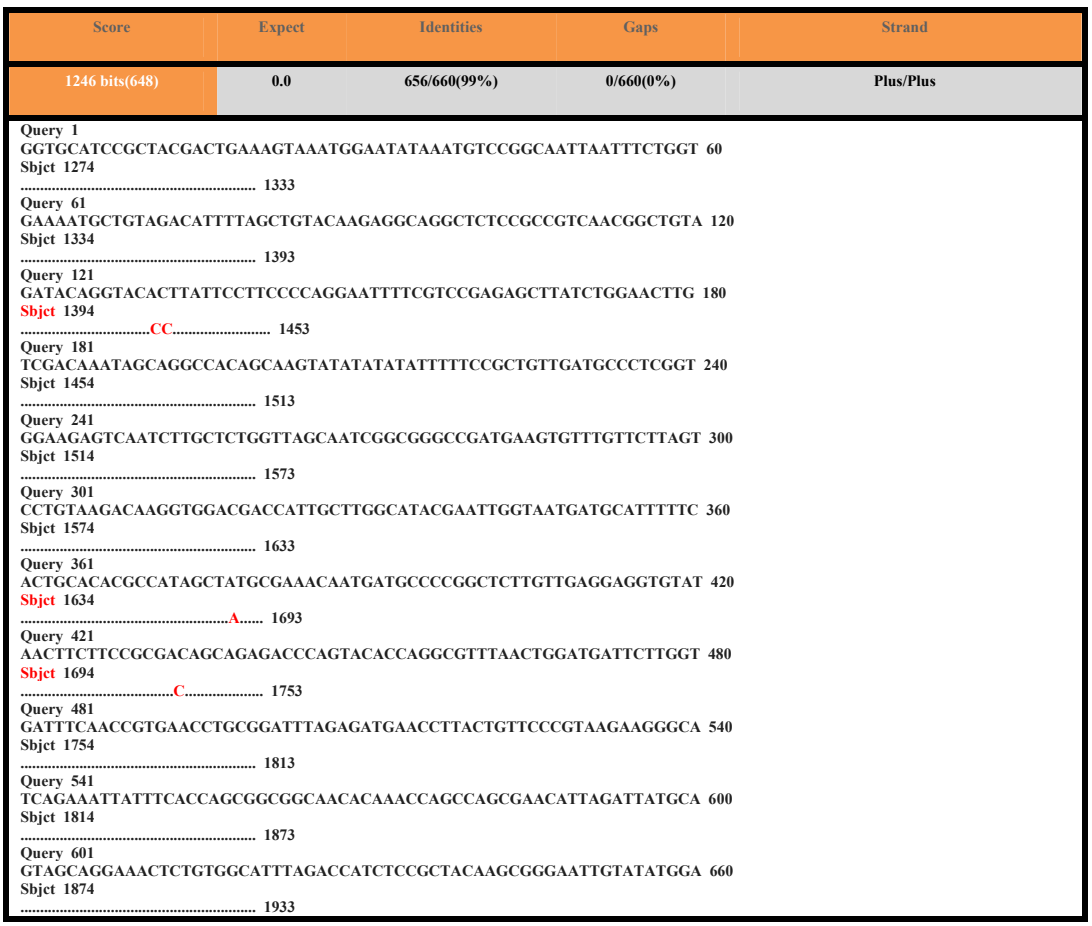
Query 1 SDLSGNIGLGTREHLLNEMVELEARRGKLALEQGKYMLQDAQTRIVEAQPAVVVKTLQRH 180
Sbjct 47 106

Query 181 GDLVEPLLEQESHARLVVMGRQGEQHQDQAQAIGSHLENVIRTVKQPILVVMTEFEAPKR 360
Sbjct 107 ....T..... 166

Query 361 FMIAYDGSITAKKALNQVLTSPLLKGLGCHLVMVSDAQSQATAELALVTESLMAANFNVV 540
Sbjct 167 .....E..... 226

Query 541 TAVCQGEVQTALEIYQLEHHIDLMVMGAYGHSRIREFFVGS 663
Sbjct 227 267

الشكل (3) : يوضح عرض محاذاة التسلسل لجين UspA وهو مكمل بنسبة ٪99 لـ تسلسل الجينات NCBI CP114353.1 ، Sequence alignment showing of UspA gene 99% complementary to CP114353.1



Escherichia coli 9142-88 cytolethal distending toxin (cdtB) genes, complete cds
Sequence ID: U04208.1Length: 2600Number of Matches: 1Range 1: 1274 to 1933GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1246 bits(648)	0.0	656/660(99%)	0/660(0%)	Plus/Plus

Query 1
GGTGCATCCGCTACGACTGAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCGGCAATTAATTTCTGGT 60
Sbjct 1274
..... 1333
Query 61
GAAAATGCTGTAGACATTTTAGCTGTACAAGAGGCAGGCTCTCCGCCGTCAACGGCTGTA 120
Sbjct 1334
..... 1393
Query 121
GATACAGGTACACTTATTCCTTCCCCAGGAATTTTCGTCCGAGAGCTTATCTGGAACTTG 180
Sbjct 1394
.....CC..... 1453
Query 181
TCGACAAATAGCAGGCCACAGCAAGTATATATATATTTTTCCGCTGTTGATGCCCTCGGT 240
Sbjct 1454
..... 1513
Query 241
GGAAGAGTCAATCTTGCTCTGGTTAGCAATCGGCGGGCCGATGAAGTGTTTGTTCTTAGT 300
Sbjct 1514
..... 1573
Query 301
CCTGTAAGACAAGGTGGACGACCATTGCTTGGCATACGAATTGGTAATGATGCATTTTTC 360
Sbjct 1574
..... 1633
Query 361
ACTGCACACGCCATAGCTATGCGAAACAATGATGCCCCGGCTCTTGTTGAGGAGGTGTAT 420
Sbjct 1634
.....A..... 1693
Query 421
AACTTCTTCCGCGACAGCAGAGACCCAGTACACCAGGCGTTTAACTGGATGATTCTTGGT 480
Sbjct 1694
.....C..... 1753
Query 481
GATTTCAACCGTGAACCTGCGGATTTAGAGATGAACCTTACTGTTCCCGTAAGAAGGGCA 540
Sbjct 1754
..... 1813
Query 541
TCAGAAATTATTTCACCAGCGGCGGCAACACAAACCAGCCAGCGAACATTAGATTATGCA 600
Sbjct 1814
..... 1873
Query 601
GTAGCAGGAAACTCTGTGGCATTTAGACCATCTCCGCTACAAGCGGGAATTGTATATGGA 660
Sbjct 1874
..... 1933

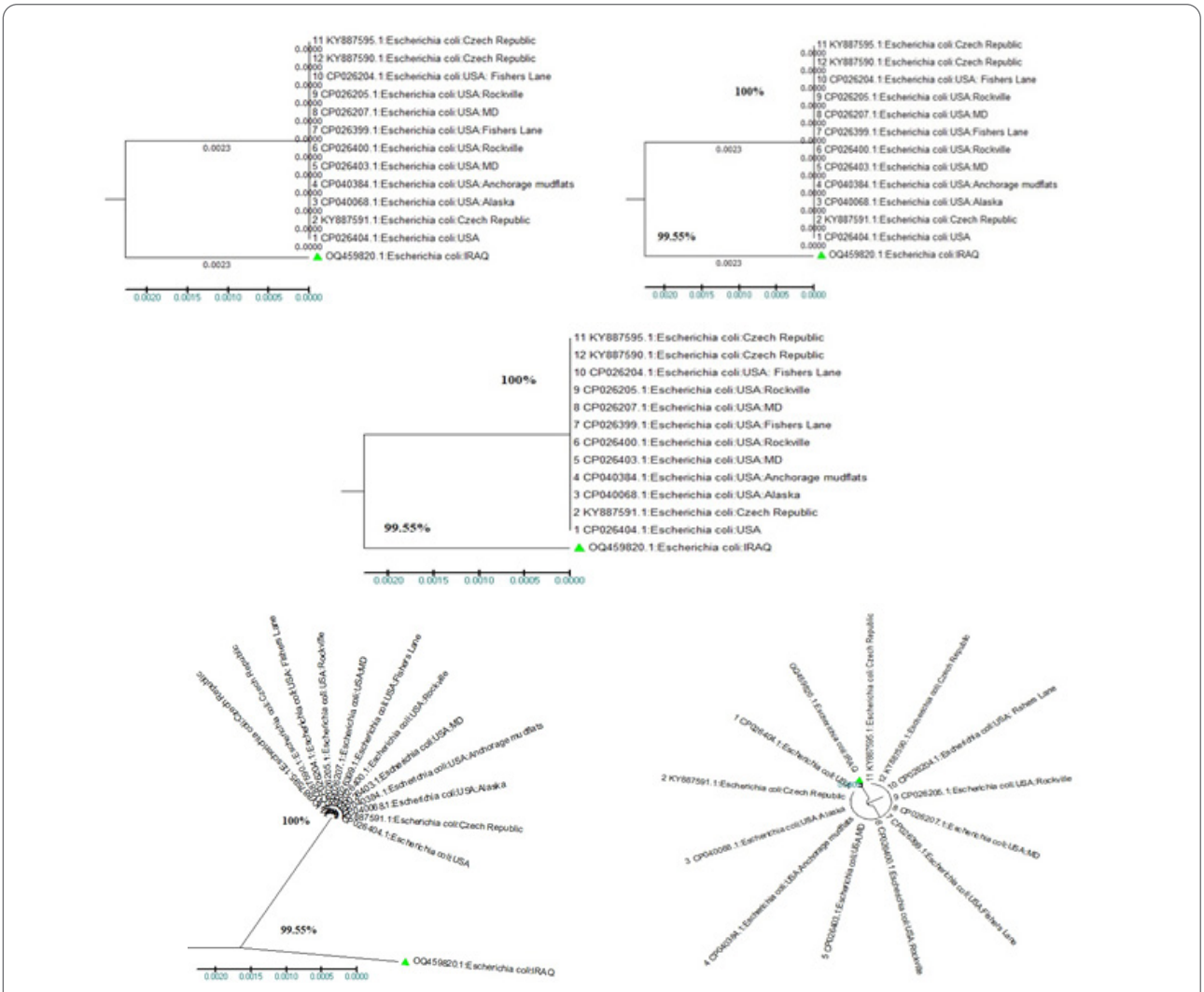
الشكل (4): تظهر تطابق التسلسل لجين cdtB المكمل بنسبة ٪99 لتسلسل قاعدة بيانات U04208.1.
Sequence alignment showing of cdt B gene 99% complementary to NCBI U04208.1

وفقاً للتطابقات الخاصة بالتسلسل المرجعي لـ NCBI (NCBI reference sequence)، وجد أنه الجينات تحتوي على عدد قليل من الطفرات mutations داخل كل عينة. وقد اختلف تكرار الطفرات mutations frequency بين العينات الست المدروسة. لقد تم تلخيص تطابق التتابع لجين cdt B و Usp A في الجدول (1)، حيث أظهرت العينة الأولى(1) أربع طفرات وكلها من نوع الانتقالية transitions ، ثلاثة كانت من نوع الانحشار missense عند 1427 زوج قاعدة و 1428 زوج قاعدة و1733 زوج قاعدة، وواحدة من النوع الصامت silent عند 1687 زوج قاعدة، كما أظهرت العينة الثانية (2) عمليتي الاستبدال غير المكافئ Transvertion أي استبدال قاعدة بيورينية بقاعدة بريميدينية او العكس عند 105460 زوج قاعدة و 105625 زوج قاعدة ونوع انتقال Transition واحد فقط عند 105872 زوج قاعدة، وأيضاً تم تسجيل أوجه التشابه similarities مع التسلسلات أو التتابعات داخل قاعدة بيانات NCBI بنسبة (99٪) لكلتا العينتين. وأظهرت العينة الثالثة (3) و الاربعة (4) والخامسة (5) والسادسة (6) طفرات وراثية من نوع الانتقالية transitions عند 105872 زوج قاعدة و 105729 زوج قاعدة و 106055 زوج قاعدة على التوالي، أما العينة (4) فقد احتوت على طفرتين أخرى وكلاهما كان عبارة عن تحويل Transversion عند 105460 زوج قاعدة و 105625 زوج قاعدة.

الجدول (1) : معلومات موجزة عن تطابق التسلسلات sequence alignment لجين *CdtB* و *UspA*

No. Of sample	Type of substitution	Location	Nucleotide	Nucleotide change	Amino acid change	Predicted effect	Source	Sequence ID with compare	Identities
1	Transition	1427	C\T	CCC\TTC	**Proline\ Phenylalanine**	Missense	**Escherichia coli CdtB gene**	**ID: U04208.1**	**99%**
	Transition	1428	C\T	CCC\TTC	**Proline\ Phenylalanine**	Missense			
	Transition	1687	A\G	GAA\GAG	**Glutamic acid\ Glutamic acid**	**Silent**			
	Transition	1733	C\T	CTT\TTT	**Leucine\ Phenylalanine**	Missense			
2	**Transvertion**	1565	G\T	GTT\TTT	**Valine\ Phenylalanine**	Missense	**Escherichia coli CdtB gene**	**ID: U04208.1**	**99%**
	Transvertion	1600	G\T	TTG\TTT	**Leucine\ Phenylalanine**	Missense			
3	Transition	1582	A\G	AGA\AGG	**Alanine\ Arginine**	Missense	**Escherichia coli CdtB gene**	**ID: U04208.1**	**99%**
	Transvertion	1893	C\G	GCA\GGA	**Alanine\ Glycine**	Missense			
4	**Transvertion**	105460	T\G	GGT\GGG	**Glycine\ Glycine**	**Silent**	**Escherichia coli UspA gene**	**ID: CP026404.1**	**99%**
	Transvertion	105625	A\C	ACC\CCC	**Threonine\ Proline**	Missense			
	Transition	105872	A\G	GAA\GGA	**Glutamic acid\ Glycine**	Missense			
5	Transition	105729	C\T	GTC\GTT	**Valine\ Valine**	Silent	**Escherichia coli UspA gene**	**ID: CP026404.1**	**99%**
6	Transition	106055	A\G	TAC\TGC	**Tyrosine\ Cysteine**	Missense	**Escherichia coli UspA gene**	**ID: CP026404.1**	**99%**

تم رسم الشجرة الوراثية neighbor- join- ing tree التطورية لبكتريا E.coli وتحليلها لجين UspA كما هو موضح في الشكل (5) والجدول (2). تم استنتاج التاريخ التطوري باستخدام طريقة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973). تظهر الشجرة المثلى optimal tree مع مجموع طول الفرع sum of branch length بما يساوي الى 0.00453931. تم رسم الشجرة مع مقياس scale لأطوال الفروع branch lengths في نفس الوحدات same units، مثل تلك الخاصة بالمسافات التطورية المستخدمة لاستنتاج شجرة النشوء والتطور. تم حساب المسافات التطورية evolutionary distances باستخدام طريقة الاحتمال المركب الأقصى Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004) وهي في وحدات عدد البدائل الأساسية لكل موقع (number of base substitutions/ site). تضمن التحليل 13 تسلسلا للنوكليوتيدات. كانت مواقع كودون Codon posi- tions المدرجة هي الأولى + الثانية + الثالثة + غير المشفرة (1st+2nd+3rd+Noncoding).

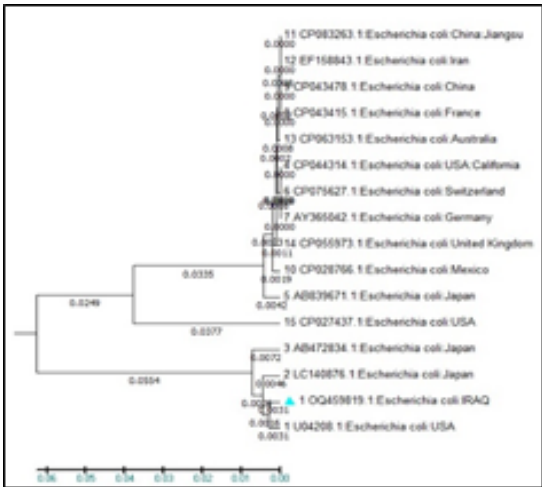


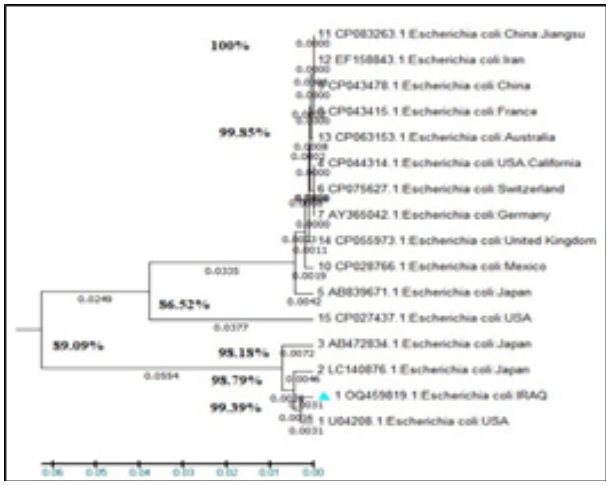
شكل (5) : الشجرة الوراثية التطورية Evolutionary relationships **الخاصة بالجين** UspA

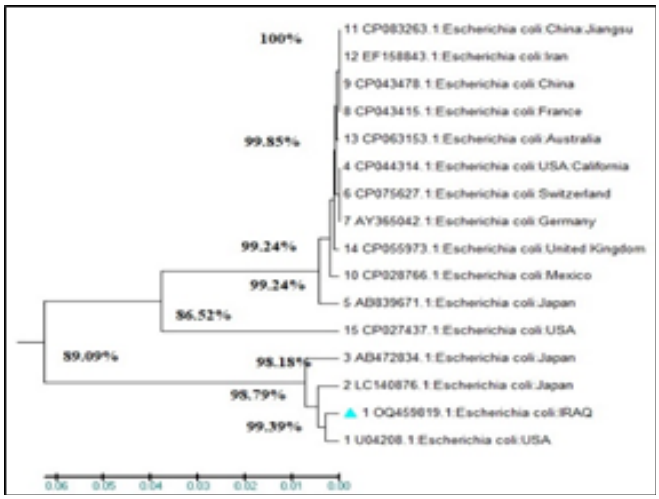
جدول (2): Evolutionary relationships of taxa
المعلومات الجينية التي تت الاعتماد عليها لرسم الشجرة الوراثية الخاصة بالجين *UspA*

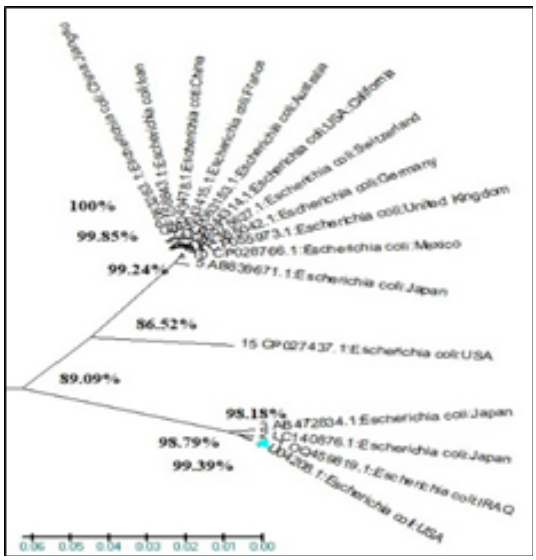
	Accession	Country	Source	Compatibility
	ID: CP026404.1	USA	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: KY887591.1	Czech Republic	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: CP040068.1	USA: Alaska	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: CP040384.1	USA: Anchorage mudflats	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: CP026403.1	USA:MD	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: CP026400.1	USA:Rockville	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: CP026399.1	USA: Fishers Lane	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: CP026207.1	USA:MD	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: CP026205.1	USA:Rockville	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: CP026204.1	USA: Fishers Lane	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: KY887595.1	Czech Republic	Escherichia coli UspA gene	99%
	ID: KY887590.1	Czech Republic	Escherichia coli UspA gene	99%

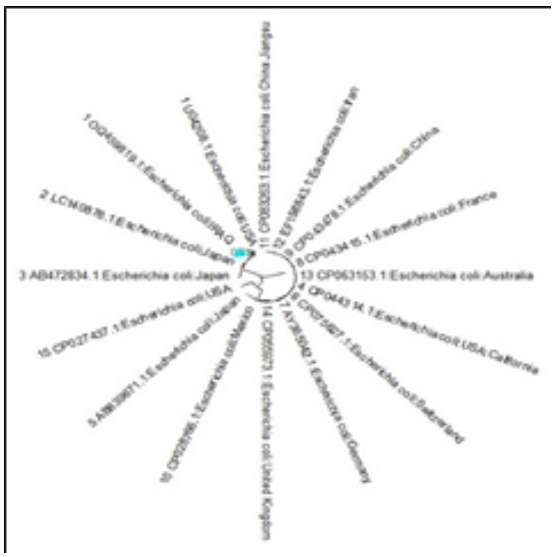
تم رسم الشجرة الوراثية neighbor- joining tree التطورية لبكتريا E.coli وتحليلها لجين cdt B كما هو موضح في الشكل (6) والجدول (3). تم استنتاج التاريخ التطوري باستخدام طريقة Un-weighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973). تظهر الشجرة المثلى optimal tree مع مجموع طول الفرع sum of branch length بما يساوي الى = 0.18673485. تم رسم الشجرة مع مقياس scale لأطوال الفروع branch lengths في نفس الوحدات same units، مثل تلك الخاصة بالمسافات التطورية المستخدمة لاستنتاج شجرة النشوء والتطور. تم حساب المسافات التطورية evolution-ary distances باستخدام طريقة الاحتمال المركب الأقصى Maximum Composite Likelihood meth-od (Tamura et al., 2004) وهي في وحدات عدد البدائل الأساسية لكل موقع number of base (substitutions/ site). تضمن التحليل 16 تسلسلا للنوكليوتيدات. كانت مواقع كودون Codon posi-tions المدرجة هي الأولى + الثانية + الثالثة + غير المشفرة (1st+2nd+3rd+Noncoding). تم القضاء eliminated على جميع الوظائف التي تحتوي على ثغرات gaps وبيانات مفقودة missing data. كان هناك ما مجموعه 660 موقع positions في مجموعة البيانات النهائية. تم إجراء التحليلات التطورية Evolutionary analyses باستخدام برنامج MEGA6 ((Tamura, et al., 2013).











شكل (6) : الشجرة الوراثية التطورية Evolutionary relationships **الخاصة بالجين** cdt B

جدول (3): Evolutionary relationships of taxa
المعلومات الجينية التي تت الاعتماد عليها لرسم الشجرة الوراثية الخاصة بالجين *CdtB*

No.	Accession	Country	Source	Compatibility
1	ID: U04208.1	USA	Escherichia coli CdtB gene	99%
2	ID: LC140876.1	Japan	Escherichia coli CdtB gene	99%
3	ID: AB472834.1	Japan	Escherichia coli CdtB gene	98%
4	ID: CP044314.1	USA:California	Escherichia coli CdtB gene	89%
5	ID: AB839671.1	Japan	Escherichia coli CdtB gene	89%
6	ID: CP075627.1	Switzerland	Escherichia coli CdtB gene	89%
7	ID: AY365042.1	Germany	Escherichia coli CdtB gene	89%
8	ID: CP043415.1	France	Escherichia coli CdtB gene	89%
9	ID: CP043478.1	China	Escherichia coli CdtB gene	89%
10	ID: CP028766.1	Mexico	Escherichia coli CdtB gene	89%
11	ID: CP083263.1	China:Jiangsu	Escherichia coli CdtB gene	89%
12	ID: EF158843.1	Iran	Escherichia coli CdtB gene	89%
13	ID: CP063153.1	Australia	Escherichia coli CdtB gene	89%
14	ID: CP055973.1	United Kingdom	Escherichia coli CdtB gene	89%
15	ID: CP027437.1	USA	Escherichia coli CdtB gene	87%

إن التغيرات في مدى وفرة العناصر الغذائية الأساسية مثل الأحماض الأمينية، والكربون، والنيتروجين، والفوسفات، والكبريتات، وكذلك عوامل الإجهاد مثل الحرارة، والمؤكسدات، والمعادن، وفك اقتران سلسلة نقل الإلكترون، والبوليميكسين، والسيكلوسيرين، والإيثانول، والمضادات الحيوية، كلها تؤدي إلى زيادة مستويات الجين UspA في E.coli (Choudhury et al., 2017)تشارك هذه البروتينات في مجموعة متنوعة من التفاعلات الخلوية للمنبهات الحيوية وغير الحيوية، كما يوحي اسمها. يعتبر استعادة الأيونات وتفاعلات نقص الأكسجة والتنقل الخلوي والتحكم في نمو الخلايا وتطورها بعضاً من وظائفها الفيزيولوجية (Chi et al., 2019). وقد تم استخلاص عائلة البروتينات المتعامدة المعروفة باسم عائلة البروتينات الفائقة UspA من البروتين (مجموعة COG0589 في GenBank وعائلة المحاذاة البروتينية PF00582 في معهد Sanger (Nachin et al., 2005). إنUspA هو عبارة عن سيرين ذاتي الفسفرة وبروتين فوسفوري ثريونين. تؤدي الطفرات في UspA إلى موت مبكر في الجينات المتحورة، في حين أن الكميات الزائدة من UspA تمنع الخلايا من التوقف عن النمو بالإضافة إلى ذلك، يؤدي حذف جينات الفئة A أو الفئة C/G

إلى حساسية تجاه المواد الضارة بالحمض النووي (Foster, 2007). كشفت نتائج الدراسة الحالية عن تغيرات مختلفة في متواليات النوكليوتيدات UspA المعزولة، وهذا ما تؤكده نتائج البحوث السابقة والتي كشفت عن العديد من الطفرات المنتشرة في جميع أنحاء تسلسل الجينUsp . كذلك ذكرت الدراسة أيضاً أنه وفقاً لتنبؤات بنية البروتين، والتي لم تظهر أي تغييرات كبيرة في عمليتي الطي والتشكيل الوظيفي للبروتين، والتي يتم الحفاظ عليها بشكل أكبر، فإن الاختلافات على مستوى النوكليوتيدات قد لا تؤثر بشكل مباشر على تلك الوظيفة. كما أنه وبصرف النظر عن ذلك، كما يمكن أن تحدد عملية الاحتكاك ورسم خرائط التعريف المناعية على بروتين الإجهاد العالمي السمات الوظيفية بالإشارة إلى الحالة المرضية. ويتم الحفاظ على طي البروتين في الطبيعة أكثر من تكوين النوكليوتيدات والأحماض الأمينية، على الرغم من هذه التعديلات ((Mishra et al., 2017. تلقى تسلسل CdtB تحليلاً أولياً في عمل سابق ركز على تفرد جين CdtB فيE.coli ، ولكن لم يتم اكتشاف أي تشابه مع أي بروتينات معروفة. وقد أصبح من الممكن توصيل CdtB بالإنزيمات المعدنية مع مجموعة متنوعة من الأدوار في أوائل القرن الحادي والعشرين بسبب ظهور تقنيات جديدة لتحليل تسلسل البروتين. اكتشف برنامج psi-blast أن تسلسل DNase I البقري يمكن مقارنته بـ EcolCdtB-II، بينما اكتشف برنامج clust-alW نفس التماثل لـ (CjejCdtB (Pons et al., 2019).

المصادر

- AL-Saadi, Z. H. A. & Abdullah, R. M. (2019). Phenotypic and Molecular Detection of Escherichia Coli Efflux Pumps from UTI Patients. Biochemical and Cellular Archives, 19: 2371-2376.
- Lee, J., Subhadra, B., Son, Y. J., Kim, D., Park, H., Kim, J., Koo, S., Oh, M., Kim, H. J. & Choi, C. (2016). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. Letters in applied microbiology, 62: 84-90.
- Mao, B.-H., Chang, Y.-F., Scaria, J., Chang, C.-C., Chou, L.-W., Tien, N., Wu, J.-J., Tseng, C.-C., Wang, M.-C. & Chang, C.-C. (2012). Identification of Escherichia coli genes associated with urinary tract infections. Journal of clinical microbiology, 50: 449-456.
- Mohammed, M. A., Alnour, T. M., Shakurfo, O. M. & Aburass, M. M. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of bacterial strains isolated from patients with urinary tract infection in Messalata Central Hospital, Libya. Asian Pacific journal of tropical medicine, 9: 771-776.
- Grasso, F. & Frisan, T. (2015). Bacterial genotoxins: merging the DNA damage response into infection biology. Biomolecules, 5, (1762-1782).
- Nipič, D., Podlesek, Z., Budic, M., Crnigoj, M. & Zgur-Bertok, D. (2013). Escherichia coli uropathogenic-specific protein, Usp, is a bacteriocin-like genotoxin. The Journal of infectious diseases, 208, 1545-1552.
- Hontz, J. S., Villar-Lecumberri, M. T., Dreyfus, L. A. & Yoder, M. D. (2006). Crystallization of Escherichia coli cdtB, the biologically active subunit of cytolethal distending toxin.

Escherichia coli strains in among outopatient with Urinary tract infection in Zakho City, Iraq, AL-Qadisiyah Journal of Pure Science; 26(5):26-40.

- Mahmood Sh.H., Turkey A. and Khalaf I. (2017). Detection of acquired resistance genes for vancomycin in local isolates Escherichia coli and its relation with other resistance models, Journal of Al-Anbar university for whole of pure;11(3):11-14.
- Vendrell J., Henry S.,Aguilar S. Heckendorm E, Godreuil S. and Solassol J. (2022). Determination of the optimal DNA extraction method to explore the Urinary microbial, Int. J. Mol. Sci.; 23(3):1336.
- Mohammad, I. A. and Ghareb, D. J. (2019). Biofilm Forming Capability, Multidrug Resistance and Detection of Associated Genes in Uropathogenic Escherichia coli isolated from Catheterized Patients. ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences, 31;(4):9-22.
- Mirzarazi M., Rezatofighi S., Pourmahdi M. and Mohajeri M. (2015). Occurrence of genes encoding enterotoxins in uropathogenic Escherichia coli isolates, Brazilian J. of Microbiol.; 46(1):155-159.
- Tanabe R.H., Dias R.C., Orsi H., et al., (2022). Characterizacion of uropathogeneic Escherichia coli. Reveals Hybrid isolated of Uropathogenic and diarreica (UPEC/DEC) E.coli Microorganismos; 10:645.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution30: 2725-2729.

Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 62, 192-195.

- Harris, D. (1968). Comparison of the patterns of pyuria in experimental pyelonephritis caused by Streptococcus faecalis and Pseudomonas aeruginosa. British Journal of Experimental Pathology, 49, 128.
- Harris, D. (1969). Staining of urinary leucocytes as an aid to the diagnosis of inflammation in the urinary tract. Journal of clinical pathology, 22, 492-495.
- Rodriguez, M., Rodriguez, A. & Maranon, R. (2011). Gram Stain as a Predictor of Urinary Infections in Children under2 years. Indian Pediatr.
- Baron E-J., Jorgensen. J Landry M-L. And Pheller M. (2007). Manuel of Clinical Microbiology (9th Ed). Washington, DC: ASM Press.
- Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N. & Esumi, M. (2016). Pitfalls of DNA quantification using DNA-binding fluorescent dyes and suggested solutions. PloS one, 11, e0150528.
- Sambrook, J. (2001). A laboratory manual. Molecular cloning, 1.
- Sabharwal, N., Dhall, S., Chhibber, S. & Harjai, K. (2014). Molecular detection of virulence genes as markers in Pseudomonas aeruginosa isolated from urinary tract infections. International journal of molecular epidemiology and genetics, 5, 125.
- Ibrahim S.A.; Mohamed D. A. and Suleman Sh. Kh. (2020). Microbial causes of Urinary Tract infection and its Sensitivity to antibiotics at Heevi Pediatric Teaching Hospital / Duhok city, Medical Journal of Babylon; IP: 10.232.74.27,17(1).
- Ibrahim M., Mohammed H. and Mer W. (2021) the prevalence of Uropathogenic

- Sneath P.H.A. and Sokal R.R. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology, 90(5), 856–867. https://doi.org/10.1111/TPJ.13299.
- Chi, Y. H., Koo, S. S., Oh, H. T., Lee, E. S., Park, J. H., Phan, K. A. T., Wi, S. D., Bae, S. bin, Paeng, S. K., Chae, H. B., Kang, C. H., Kim, M. G., Kim, W. Y., Yun, D. J., & Lee, S. Y. (2019). The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses. Frontiers in Plant Science, 10.
- Nachin, L., Nannmark, U., & Nyström, T. (2005). Differential Roles of the Universal Stress Proteins of Escherichia coli in Oxidative Stress Resistance, Adhesion, and Motility. Journal of Bacteriology, 187(18), 6265. https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6265-6272.2005.
- Foster, P. L. (2007). Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 42(5), 373. https://doi.org/10.1080/10409230701648494.
- Mishra, A. K., Deepak Singh, D., Kumarsen, G., Gupta, G., Sharma, N., Kumar, N., Nayakvadi, S., & Paul, S. (2017). UspA Gene Based Characterization of Escherichia coli Strains Isolated from Different Disease Conditions in Goats. Journal of Animal Research, 7(6), 1123–1128. https://doi.org/10.5958/2277-940X.2017.00168.1.
- Pons, B. J., Vignard, J., & Mirey, G. (2019). Cytolethal Distending Toxin Subunit B: A Review of Structure–Function Relationship. Toxins, 11(10). https://doi.org/10.3390/TOXINS11100595.